

Accession Nbr :

1985-023382 [04]

Sec. Acc. CPI :

C1985-010177

Title :

Alcaligenes strain for acrylate prodn. - from acrylic acid and di:hydric alcohol
in phosphate buffer soln.

Derwent Classes :

A41 D16 E17

Patent Assignee :

(NITL) NITTO ELECTRIC IND CO

Nbr of Patents :

2

Nbr of Countries :

1

Patent Number :

JP59220196 A 19841211 DW1985-04 12p *

AP: 1983JP-0095250 19830530

JP88029996 B 19880616 DW1988-28

Priority Details :

1983JP-0095250 19830530; 1985JP-0073038 19830528

IPC s :

C12N-001/20 C12P-007/62 C12R-001/05

Abstract :

JP59220196 A

Strain belonging to the genus Alcaligenes can produce acrylate from acrylic acid and dihydric alcohol of formula HOROH where R is 2-6C alkylene.

The strain is e.g. Alcaligenus faecalis. The strain is cultured in the medium contg. meat extract, polypeptone and NaCl with shaking for 24 hrs. at 30 deg. C, and the cells obtd. are washed with phosphate buffer soln. The crude enzyme solution is then obtd. by sonic treatment of the cells, and the reaction between acrylic acid and alcohol by the crude enzyme soln. is conducted in the phosphate buffer soln. (0/0)

Manual Codes :

CPI: A01-D10 D05-C D05-H05 E10-E04D E10-G02B

Update Basic :

1985-04

Update Equivalents :

1988-28

⑯ 日本国特許庁 (JP) ⑮ 特許出願公開
⑰ 公開特許公報 (A) 昭59—220196

⑤Int. Cl.³
C 12 P 7/62
//(C 12 P 7/62
C 12 R 1/05)

識別記号 庁内整理番号
6760—4B

④公開 昭和59年(1984)12月11日
発明の数 2
審査請求 有

(全 12 頁)

④アクリル酸エステル生産菌およびそれによる
アクリル酸エステルの製法

②特 願 昭58—95250
②出 願 昭58(1983)5月30日
②發明者 川崎隆志
茨木市下穂積1丁目1番2号日
東電気工業株式会社内
②發明者 橋口俊男
茨木市下穂積1丁目1番2号日

東電気工業株式会社内
②發明者 木原康夫
茨木市下穂積1丁目1番2号日
東電気工業株式会社内
②發明者 日比野健
茨木市下穂積1丁目1番2号日
東電気工業株式会社内
②出願人 日東電気工業株式会社
茨木市下穂積1丁目1番2号
②代理人 弁理士 山本秀策

明細書

1. 発明の名称

アクリル酸エステル生産菌およびそれによるアクリル酸エステルの製法。

2. 特許請求の範囲

1. アルカリグネス属に属し、アクリル酸と一般式 $HOROH$ (ただし、Rは炭素数2~6の直鎖のアルキレン基)で表わされる二価アルコールとからアクリル酸エステルを生産する菌。
2. 前記アルカリグネス属菌がアルカリグネス・フェーカリスである特許請求の範囲第1項に記載の菌。
3. 前記アルカリグネス・フェーカリスがアルカリグネス・フェーカリス TH886 株およびアルカリグネス・フェーカリス TK4985 株のうちの少なくとも一方である前記特許請求の範囲第2項に記載の菌。
4. アルカリグネス属に属する菌により、アクリル酸と一般式 $HOROH$ (ただし、Rは炭素数2~6の直鎖のアルキレン基)で表わされる二価ア

ルコールとからアクリル酸エステルを生産する。
微生物によるアクリル酸エステルの製法。

5. 前記アルカリグネス属菌がアルカリグネス・フェーカリスである特許請求の範囲第4項に記載の製法。

6. 前記アルカリグネス・フェーカリスがアルカリグネス・フェーカリス TH886 株およびアルカリグネス・フェーカリス TK4985 株のうちの少なくとも一方である前記特許請求の範囲第5項に記載の製法。

8. 発明の詳細な説明

技術分野：

本発明はアクリル酸エステル生産菌、特に水酸基を有するアクリル酸エステルの生産菌およびその菌を用いたアクリル酸エステルの製法に関する。
従来技術：

エステル合成をエステラーゼの逆反応で行なう研究は、古くから行なわれている。その一つに、リバーゼを用いる反応において、酸成分とアルコール成分を変えたときの研究報告がある(辻版、

岩井、奥村ら、*Biochimica et Biophysica Acta*, 575(1979)p 156-165)。そこでは、酸成分として酢酸、アロピオン酸、酪酸をはじめステアリン酸、オレイン酸、リンゴ酸、コハク酸などが検討され、アルコール成分としては1級アルコール、1級ジオール、フェノール類、2級アルコール、2級ジオール、3級アルコール、糖アルコールなどのあらゆるアルコール類が検討されている。そこに使用されているリバーゼ類は4種であり、それぞれの起源は *Aspergillus niger*, *Rhizopus delemar*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium cyclopium* である。そのうちの前二者が特に低分子量の酸に対してもエステル合成能を有することが示されている。しかし、いづれにしろ、この研究には酸成分として、アクリル酸が用いられていない。本発明者は上記報告に開示されたリバーゼ(天野製薬錠剤および生化学工業錠剤)を用い検討したが、アクリル酸はいかなるアルコール類ともエステル合成し得ないことを確認した。その他の従来のエステル合成に関する報告においても酸成分にアクリル酸を用

いた反応は報告されていない。

アクリル酸とアルコールとのエステル合成により得られるアクリル酸エステルは、ビニル基を有するため、種々の工業材料となり得る重合体原料として極めて有用である。例えば、このアクリル酸エステルを他の単量体と共に重合して得られる高分子は、粘着剤、接着剤、およびフィルムなどとして用いられる。さらに、また、このアクリル酸エステルが水酸基を有するので親水性を持ち官能基としても作用し、それより得られる重合体は易吸着性ポリマーとなり、接着剤、塗料、その他の多くの用途を有しあつ新規な用途開発も期待される。このようなアクリル酸エステルの合成は、化学合成により可能ではある。しかし、化学合成によると、反応条件が過酷であるため、そのための付帯設備とスペースと費用がかさむ。しかも、作業環境が汚染されやすく環境公害の原因にもなる。このエステル合成を微生物を用いた生物学的反応により行うと、低温・低圧という温和な条件下で反応できしかも基質特異性を有するため、環境汚

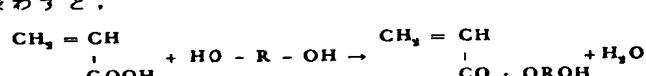
染のおそれがないうえに設備費なども安くつく。

発明の目的：

本発明の目的は、アクリル酸と二価アルコールとにより水酸基を有するアクリル酸エステルを生産する新規な微生物およびそれを用いた生物学的反応によるアクリル酸エステルの製法を提供することにある。本発明の他の目的は、生物学的反応により安全かつ安価にアクリル酸エステルを製造する方法を提供することにある。本発明のさらに他の目的は、工業材料となり得る有用な重合体原料としてのアクリル酸エステルを生産する菌およびそれを用いたアクリル酸エステルの製法を提供することにある。

発明の要旨：

本発明のアクリル酸エステル生産菌は、アルカリゲネス属に属しアクリル酸と一般式 $HOROH$ (ただし、Rは炭素数2~6の直鎖のアルキレン基で表わされる上記二価アルコールとから水酸基を有するアクリル酸エステルを生産するもので、そのことにより上記目的が達成される。反応式で表わすと、



の反応が行なわれる。

本発明の微生物は、化学工業原料を扱っている工場などの土壤(茨木市、豊橋市)から分離・採

集した新菌株である。この新菌株は、後述する菌学的性状をもとに「Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th editor, 1974」の細菌分類書を参考にして同定され、アルカリゲネス属に属する細菌であるところから、それぞれ、アルカリゲネス・フェーカリス (*Alcaligenes faecalis*) TH886 株 (受託番号: 機工研菌寄第7088号 (FERMP-7088)) およびアルカリゲネス・フェーカリス (*Alcaligenes faecalis*) TK4985 (受託番号: 機工研菌寄第7084号 (FERM P-7084)) と命名された。

菌学的性質

本発明の *Alcaligenes faecalis* TH886 株と *Alcaligenes faecalis* TK4985 株の菌学的性質を第 1 表に示す。

以下余白

| | | | |
|--|-----------------------------|--------|----------------------------|
| ④ 肉汁ゼラチン穿刺培養 | 左 | 左 | 左 |
| 平滑で半透明、無色。 又、拡散性色素の生成はない。 | 平滑、光沢がある。断面 平坦である。 | (静置培養) | 底部に菌の沈殿が見られる。表面生育はない。 |
| ⑤ 肉汁液体培養 | 左 | 左 | 左 |
| 表面によく生育、穿刺部 にそつて生育するが下層 部には殆んど生育しなかつた。 | 増殖は速いが培地は濁り、 比較的均一に生育する。 | (振盪培養) | 均一であり複数ではない。 かつ旺盛な生育を示す |

④ 肉汁ゼラチン穿刺培養

| | | | |
|---|---------------------------------|---|---|
| ⑥ リトマスマミルク | 左 | 左 | 左 |
| ゼラチンは液化せず 菌の生成有り、クロット を形成した。アルカリを 添加することにより凝固 物は溶解した。 | アルカリを 添加することにより凝固 物は溶解した。 | 性 | 性 |
| ① 糖酸塗の還元 | 陰 | 陰 | 陰 |
| ② 脱窒反応 | 陰 | 陰 | 陰 |
| ③ M.R. テスト | 性 | 性 | 性 |
| ④ V.P. テスト | 陰 | 陰 | 陰 |

⑥ リトマスマミルク

| 菌学的性質 | <i>Alcaligenes faecalis</i> TH886 | <i>Alcaligenes faecalis</i> TK4985 |
|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| (a) 形態 | 短桿菌 0.8 × 1.2~2.4 μ | 短桿菌 0.8 × 1.2~2.4 μ |
| ① 細胞の形および大きさ | 無 | 無 |
| ② 細胞の多形性的有無 | 有 | 有 |
| ③ 運動性的有無 | 無 | 有 |
| ④ 菌毛の産生状態 | 無 | 有 |
| ⑤ 胞子の有無 | 無 | 無 |
| ⑥ グラムの染色性 | 性 | 性 |
| (b) 各培地における生育状態 | 性 | 性 |
| ① 肉汁液体培養 | 陰 | 陰 |
| ② 肉汁ゼラチン穿刺培養 | 性 | 性 |
| ③ リトマスマミルク | 性 | 性 |
| ④ 糖酸塗 | 陰 | 陰 |
| ⑤ 脱窒反応 | 陰 | 陰 |
| ⑥ M.R. テスト | 性 | 性 |
| ⑦ V.P. テスト | 陰 | 陰 |
| ⑧ 直径 1~4 mm のコロニー | | |

| 好気性 非分解 | 好気性 分解 | | 好気性 ガス |
|-----------------|-----------|----|-----------|
| | 酸 | ガス | |
| ⑤ 酸素に対する態度 | - | - | - |
| ⑥ D-Fテスト | - | - | - |
| ⑦ 糖から酸およびガスの生成 | - | - | - |
| L-アラビノース | - | - | - |
| D-キシロース | - | - | - |
| D-グルコース | - | - | - |
| D-マンノース | - | - | - |
| D-フクトース | - | - | - |
| D-ガラクトース | - | - | - |
| 麦芽糖 | - | - | - |
| ショ糖 | - | - | - |
| 乳糖 | - | - | - |
| トレハロース | - | - | + |
| D-セロビオース | + | + | + |
| D-ソルビトール(ソルビット) | + | + | + |
| イノシット | + | + | + |
| L-アラビノ糖 | + | + | + |
| L-アスパラギン酸 | + | + | + |

白下全志

菌株の同定

次に本発明の菌株を *Alcaligenes* 属に属する菌株であると同定した根拠を以下に示す。

本菌株 TH886 株および TK4985 株はいずれも上記試験結果より「グラム陰性であり、分裂により増殖する好気性細菌であり光合成によつては増殖しない」という特徴を有する。このような細菌は、Bergey's Manualによれば第 7 部に分類されている。ここに属する科および属は次のようになる。

1. **Pseudomonadaceae** 科
 2. **Azotobacteraceae** 科
 3. **Rhizobiaceae** 科
 4. **Methylomonadaceae** 科
 5. **Halobacteriaceae** 科
 6. **Alcaligenes** 属
 7. **Acetobacter** 属
 8. **Brucella** 属
 9. **Bordetella** 属
 10. **Francisella** 属
 11. **Thermus** 属

これら 11 の科と属の性状と、本菌株 TH 886 株および TK 4985 株の性状とを以下に比較する。本菌株はいずれも *Alcaligenes* 属を除く 10 の科・属とは第 2 表に示す医学的性質において全く異なる。

第 2 装

| 科・属 | 菌学的性質 | TH886株・TK4985 株の性質 |
|-------------------|--|-------------------------------------|
| Pseudomonadaceae | O/Fテストで酸化的 | 非分解 |
| Azotobacteraceae | 空中窒素を固定する Yeast like であり $\phi 2\mu$ 以上 | 固定しない 0.6 ~ 0.8 μ (ϕ) |
| Rhizobiaceae | 豆科植物に寄生。その時 N_2 を固定 多くの炭水化物を利用でき る。 形状のかわることがよくあ る。 | 利用できない 不変 |
| Methylomonadaceae | 炭素源としてメタン・メタ ン | メタノールを質化し |

| | | |
|-------------------------|--|---------------------|
| | ノールを利用する。 他の炭素源は利用できない | ない。 |
| <i>Halobacteriaceae</i> | 生育に2M以上のNaClを要求 | 要求せず |
| <i>Acetobacter</i> | エタノールから酢酸をつくる。 ヘメソース、グリセロールを質化 | 作らない ヘキソースを利用しない |
| <i>Brucella</i> | 運動性なし ビタミンを生育に要求(チアミン、ナイアシン、ビオチン) | 運動性有 要求せず |
| <i>Bordetella</i> | (小さい短桿菌) minute coccobacilliである。 (0.2-0.8μm by 0.5-1.0μm) 生育にニコチン酸、システィン、メチオニンが必要である。 | 要求せず |
| <i>Francisella</i> | 非常に小さい(0.2μm以下) 球形・卵形 運動性なし | 短桿菌 運動性有 |

| | | |
|----------------|---|------------|
| <i>Thermus</i> | 長さが5~10μある時はそれ以上で糸状である。 運動性なし 高温菌である(適温70~72°C) | 短桿菌 中温菌 |
|----------------|---|------------|

他方、本菌株はいずれも、第8表に示すように、*Alcaligenes* 属と多くの点で性質が共通する。

第 8 表

TH836・TK4985とアルカリゲネス属との共通点

1. 好気性
2. グラム陰性
3. 酸酵的でない
4. 運動性有 緩毛(1~8本)
5. 大きさ 0.5-1.2μm by 0.5-2.6μm
6. 通常 単独で存在
7. 色素を作らない
8. オキシダーゼ: 陽性
9. 寒天を分解しない
10. カゼイン・ゼラチンを分解しない
11. 生育の適温 20~87°C
12. pH 7.0ですばやく生育する
13. ガス状N₂を固定しない

以上の結果から、本発明の菌株 TH836 株および TK4985 株は *Alcaligenes* 属に属する細菌であると同定される。次に本発明の菌株の種を決定するためにこの属の既知の 4 種と比較した結果を第4表に示す。

第 4 表

| 種名 性質 | TH836株・TK4985 株との比較 |
|---------------------------|------------------------|
| 1. <i>A. faecalis</i> | |
| 单一炭素源・エネルギー源として次の化合物を質化する | |
| acetate | + |
| propionate | - |
| butyrate | - |
| aspartic acid | + |
| asparagine | + |
| histidine | + |
| glutathione | + |
| 炭水化物を利用しない | 同じ |

2. *A. aquamarinus*

グルコース、フラクトース、マルトース、他の炭水化物を質化する。
デンプンを加水分解する。
アンモニウム塩と硝酸塩を利用するしない。

酸化しない
加水分解しない
利用する

3. *A. eutrophus*

グルコース、フラクト^{ース}、テストステロン、フェノール、ベンゾエートを利用できる。

利用できない

4. *A. paradoxus*

スライサーであり、黄色の色素をつくる。
グルコース、フラクトース、マルトース、アラビノース、ガラクトースなどを利用する。

色素を生成しない
利用しない

本発明の菌株は、いずれも *Alcaligenes faecalis* とは、プロピオン酸と酪酸の質化性能を欠く点が異

なるにすぎず、他の特徴はすべてこれと一致する。よつて、本菌株を *Alcaligenes faecalis* にきわめて近縁の菌株であり *Alcaligenes faecalis* と同定した。

培養条件

培地としては格別である必要はなく、肉エキス、酵母エキス、麦芽エキス、ペプトンなどの有機栄養源、およびリン酸塩、マグネシウム、ナトリウム、カリウム、マンガン、鉄などの無機栄養源等を適宜含有する通常の培養でよい。

炭素源としては、炭素源質化性試験において基質となつた各種アミノ酸、TCAサイクルメンバーの有機酸などが用いられる。窒素源としては、硝酸塩、亜硝酸塩およびアンモニウム塩などの無機窒素やアミノ基の有機窒素などが用いられる。培養温度は20°C~35°C好ましくは25°C~30°Cである。培養PHは5~8好ましくは6.5~7.5であり、1日~8日間好気的に搅拌又は振とうしながら培養を行なう。

反応組成

本発明のエステル反応は、このような培養条件

のもとで本発明菌株を培養し、その休止菌体、菌体抽出液（粗酵素液）、精製酵素、固定化菌体および固定化酵素状態のうちの少なくとも一つを適当に選んで用いる。本発明の水酸基を有するアクリル酸エステルの合成に必要な反応系の基本組成は第5表に示される。なお、この合成に当つて媒体を用いる場合には水媒体とするのが一般的である。

第 5 表

| 組 成 | 最終濃度 |
|------------------|-----------|
| リン酸バッファー(pH 8.0) | 0.2M |
| アクリル酸 | 1% (v/v) |
| ジヒドロキシアルコール | 10% (v/v) |
| 水 | |
| 菌体もしくは菌体抽出液 | |

菌体および抽出液の添加量は、菌体懸濁液として最終濃度が660nmの吸光度(OD 660)で0.1以上、通常は1.0~2.0の範囲にある。菌体抽出液は、

菌体を超音波破碎機やフレンチプレスで処理して得られ、280nmの吸光度(A280)が0.1以上、通常は0.5~2.0の範囲で用いられる。

反応PHは5~9の範囲にあればよい。好ましくは6.5~7.5である。

アクリル酸の使用可能な濃度は、0.1% (v/v) ~ 5% (v/v) であり、好ましくは0.5% (v/v) ~ 2% (v/v) の範囲に選ばれる。アクリル酸の使用により反応系組成のpHが低下しアクリル酸の消費と共にpHが上昇する。このようないずれも反応系のpHが常時7前後になるようにするために本基本組成ではバッファーとして0.2Mのリン酸バッファーが用いられる。リン酸バッファーに代えて重炭酸-炭酸Naバッファー、トリス塩酸バッファーなどを用いることもできる。バッファー濃度も0.2Mに限定されることなく、使用されるアクリル酸量や反応速度などに応じて適宜選択される。

前記二価アルコールは、酵素の安定化に悪影響を与えることがないため量的制限は特にない。

しかし、アクリル酸1モル当たり、少なくとも0.5モルの二価アルコールが用いられる。上記アルコールの使用量の上限は前記のようにいくら多くてもよいが、通常0.5% (v/v) ~ 10% (v/v) で用いられる。モル比ではアクリル酸1モル当たり通常0.5~5.0モル、好ましくは1~2.0モルの二価アルコールが用いられる。ジヒドロキシアルコールの添加量に応じて生成する水酸基を有するアクリル酸エステルの量も多くなる。反応温度は20°C~40°Cの範囲内であれば良い。好ましくは25°C~35°Cである。反応時間は基質添加量により幾分異なるが約10分以上あれば検出可能である。

生成物の検出

反応終了後の系から菌体を遠心分離により除く。その上澄液を直接ガスクロマトグラフあるいは液体クロマトグラフにかけ生成物質の検出定量を行なうか、もしくはその上澄液を必要に応じてさらに熱処理（例えば100°Cにて1分間）し夾雜する蛋白を除去してからガスクロマトグラフもしくは液体クロマトグラフにかけ生成物質の検出定量を

特開昭59-220196(8)

行なう。検出は次のような条件で行なわれる。

① ガスクロマトグラフ

| | |
|--------|-----------------|
| 機種 | 日立168型ガスクロマトグラフ |
| 検出方法 | FID |
| カラム | Tenax GC (1 m) |
| カラム温度 | 230°C |
| キャリアガス | 窒素 |
| 流量 | 80 ml/min |

② 液体クロマトグラフ

| | |
|-----|---------------------|
| 機種 | Varian モデル 5000 |
| カラム | MCH 10 |
| 溶離液 | 水:アセトントリル = 50 : 50 |
| 流量 | 1.0 ml/min. |
| 波長 | 200 nm |

例えば、アクリル酸と1・4ブタンジオールとの反応で生成するヒドロキシブチルアクリレートについてはガスクロマトグラフでは約5分後、液体クロマトグラフでは約4分後にピークが現われる。二価アルコールがエチレングリコールであればヒドロキシエチルアクリレートが生成され、液体ク

ロマトグラフでは8.2分にピークが見られる。

生成物質の確認

生成物質の確認は次のようにして行なつた。

1. アクリル酸、二価アルコールおよび酵素の3者が同時に存在したときだけ、生成物のピークが見られ（液体クロマトグラフにて）、そのピークが時間とともに増加する。

2. ガスクロマトグラフおよび／もしくは液体クロマトグラフにより既知物質と同じリテンションタイムを示した。（既知物質は化学合成にて入手した）

3. GC - Mass (日立製)によるCI法により生成物質が既知物質と同じ分子量であることを確認した。

生成されたアクリル酸エステルを採取するには常法の蒸留もしくは溶剤抽出が用いられる。

酵素の安定性

Alcaligenes faecalis TH886株のエステル化能を有する酵素の安定性について、超音波破碎時（海上電気錫のTA4280振動子4280S; 2~4Aにて

使用）の酵素の安定性を第1図に示す。図はソニツク処理時間とヒドロキシブチルアクリレートの生成反応活性との関係を示している。活性は、1分間にヒドロキシブチルアクリレート $1 \mu\text{mol}$ 生成したとき1ユニットとした。第1図から本菌株TH886株のエステル化酵素は比較的安定であることがわかる。

エステル化反応におけるpH

反応系組成とそこに用いる各種バッファーを下記のように調整し、本菌株TH886株を用いたヒドロキシブチルアクリレートの生成に及ぼすpHの影響を調べた。その結果を第2図に示す。図から酵素活性はpH 5~10付近まであることがわかる。

反応組成

| | |
|---------------|--------|
| 各種バッファー | 1 ml |
| 10%アクリル酸 | 0.5 ml |
| 10%1・4ブタンジオール | 0.5 ml |
| 酵素 A280 = 140 | 8.0 ml |

| 緩衝液 | | |
|------------------|------|--------|
| 緩衝液 | 調製pH | 反応系のpH |
| リン酸カリウム (1M) | 5 | 3.5 |
| | 6 | 4.1 |
| | 7 | 5.4 |
| | 8 | 6.8 |
| 重炭酸ナトリウム (1M) | 9 | 7.1 |
| | 10 | 8.1 |
| | 11 | 9.8 |

実施例：

以下に本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例1

(肉体腔液の調製)

肉エキス10g、ポリペプトン10g、NaCl 5g、蒸留水1L、そしてpH 7.0の組成の肉汁液体培地100mlを調製した。これを500ml容坂口フラスコに入れ殺菌して後、これにAlcaligenes faecalis TH886株を植菌した。これを30°Cにて24時間振とう培養した。この培養液を遠心分離(10,000

(rpm, 10 min.) し、沈殿した菌体を pH 7.0 のリン酸バッファー 0.05M にて 1 回洗浄した。この菌体を同じバッファーにて OD 660 = 1.0.0 になるよう希釈し、これを菌体懸濁液とした。

(粗酵素液の調製)

得られた菌体懸濁液を海上電気製超音波破碎機にて氷冷水で冷却しつつ 20 分間破碎した。これを遠心分離 (15,000 rpm, 80 分間) し、その上澄液を粗酵素液とした。

(反応組成)

次の反応組成にて 30 °C で反応し、得られた生成物をガスクロマトグラフを用いて分析した。

| 組成 | | 添加量 |
|-------------|--------------|--------|
| リン酸バッファー | 1M (pH 8.0) | 0.2 ml |
| アクリル酸 | 10% 水溶液 (%) | 0.1 ml |
| 1・4 ブタンジオール | 各種濃度 | 0.1 ml |
| 粗酵素液 | A280 = 1.4.0 | 0.6 ml |

1・4 ブタンジオールの濃度は最終濃度で 1.0.0% (v/v), 5.0% (v/v), 8.0% (v/v), 1.0% (v/v), 0.5% (v/v)

とした。

(結果)

1・4 ブタンジオール濃度のエステル生成における影響を調べた。その結果を第 8 図に示す。エステル生成量は対アクリル酸吸率 (モル %) で表示される。1・4 ブタンジオール量が多くなるにつれ生成するヒドロキシブチルアクリレートの量も多くなることがわかる。また、アクリル酸 10% (最終濃度) と 1・4 ブタンジオール 10% (最終濃度) との (1 : 1 の) 反応でもジアクリレートの生成は生成アクリル酸エステルの 1% 以下であつた。しかし、アクリル酸と二価アルコールとの比が 1 : 2 以上になるとジアクリレートはまったく生成しなかつた。化学合成においてはアクリル酸と二価アルコールとを 1 : 1 で反応させると、生成したアクリル酸エステルに対し 5 ~ 15% のジアクリレートが生成する。ジアクリレートは重合時の反応系をゲル化させるため、それが生成しないようにすることが必要である。化学合成ではそれは極めてむづかしい。それゆえ、重合時の仕

込み濃度を低くおさえねばならないという欠点があつた。本発明のエステル反応においてはジアクリレートの生成は微量もしくは皆無であるため、このような問題はない。

実施例 2

実施例 1 で示した培地にて同様に *Alcaligenes faecalis* TH 886 株と *Alcaligenes faecalis* TK 4985 株をそれぞれ培養した。得た各菌体を OD 660 = 1.0.0 になるように 0.05M のリン酸バッファー (pH 7.0) にて、菌体懸濁液を調製した。この菌体懸濁液を実施例 1 と同様に処理して粗酵素液を調製した。この菌体懸濁液もしくは市販の酵素液を用いて次の反応組成にて 30 °C で 2 時間反応を行つた。市販のリバーゼとしては、*Aspergillus* に属する糸状菌から生産されたリバーゼ (リバーゼ AP : 天野製薬) や *Mucor* に属する糸状菌から生産されたリバーゼ (リバーゼ M-AP : 天野製薬) を用いた。

以下余白

| 反応組成 | | 添加量 |
|--|-------------|--------|
| リン酸バッファー | 1M (pH 8.0) | 0.2 ml |
| アクリル酸 | 10% 水溶液 (%) | 0.1 ml |
| エチレングリコールまたは 1・4 ブタンジオール または 1・6 ヘキサンジオール | 100% | 0.1 ml |
| 菌体懸濁液または粗酵素液 | | 0.6 ml |

市販リバーゼの酵素溶液濃度は 8 mg/ml であつた。1・6 ヘキサンジオールの使用量は 0.1 g であつた。この場合には反応系の固形濃度を調整する意味で水 0.1 ml を系にさらに添加した。生成物質を液体クロマトグラフもしくはガスクロマトグラフで確認した。いずれの反応系においてもジアクリレート生成は検出されなかつた。結果を第 6 表に示す。

以下余白

第 6 表

| | 生成物の収率% (対アクリル酸モル%) | | |
|-----------|---------------------|--------------------|---------------------|
| | ヒドロキシエチル アクリレート | ヒドロキシブチル アクリレート | ヒドロキシヘキシル アクリレート |
| TH886 株 | 2.2 | 5.0 | 1.0 |
| TK4985 株 | 2.8 | 6.5 | 1.1 |
| リバーゼ AP | 0 | 0 | 0 |
| リバーゼ M-AP | 0 | 0 | 0 |

実施例 8

実施例 1 と同様にして得た TH886 株および TK4985 株の培養液を遠心分離後、0.05M (pH 7.0) のリン酸バッファーにて OD660 が 1.0 の菌体懸濁液を調製した。この菌体懸濁液に 8 倍量のアセトン (-20°C) を加え、10 分間攪拌した後遠心分離 (10000 rpm, 10 分) した。沈殿した菌体をさらにアセトンにて 2 回洗浄した。これを吸引式デシケーター中にて完全に乾燥し、アセトンドライ菌体を得た。この菌体を用いて反応を行なつた。

反応組成

添加量

| | |
|----------------------|--------|
| リン酸バッファー 1M (pH 8.0) | 0.2 ml |
| アクリル酸 10% 水溶液 (v/v) | 0.1 ml |
| 1・4 ブタンジオール 100% | 0.1 ml |
| 水 | 0.6 ml |
| アセトンドライ菌体 | 20 mg |

反応は 80°C にて 2 時間行なつた。その結果、対アクリル酸収率 (モル%) は TH886 株では 4.2%，そして TK4985 株では 4.5% であつた。

実施例 4

実施例 1 と同様にして得た TH886 株の粗酵素液を第 7 表に示したように常法に従つて精製し、比活性が 40 倍になつた部分精製酵素を得た。

以下余白

第 7 表

| 条件 | 容積 [ml] | 全タンパク [mg] | 全活性 [U] | 回収率 [%] | 比活性 [$\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$] | 精製度 (倍) | 粗酵素液 | |
|---------------|---------|------------|---------|---------|--|---------|------|---|
| | | | | | | | 内 | 外 |
| 無細胞抽出液 | 8.7 | 131.7 | 31 | 100 | 0.024 | 1 | | |
| 純 安 分画 | 3.2 | 75.2 | 26 | 83 | 0.035 | 1.4 | | |
| DNC-cellulose | 6.0 | 40.3 | 10.2 | 33 | 0.25 | 10.1 | | |
| 濃縮(脱水封罐) | 4.7 | 31 | 8.0 | 26 | 0.26 | 10.5 | | |
| Bugidal 5m | 2.35 | 4.6 | 4.4 | 14 | 0.96 | 10.5 | | |

この活性は、アクリル酸と 1・4 ブタンジオールとの反応におけるヒドロキシブチルアクリレートの生成によつて評価された。

次にこの部分精製酵素をセファロース 4 B にて CNBr 活性化法 (R. Axen, Nature, 214, 1802 (1967)) で固定化した。得られた固定化酵素を内径 1.2 mm 長さ 30 cm のカラムに詰め、上部から下記の組成の反応液を 10 cm/1 時間の流速で流した。その結果、対アクリル酸当り 1 モル% の収率でヒドロキシブチルアクリレートが生成された。

反応液組成

添加量

| | |
|----------------------|--------|
| リン酸バッファー 1M (pH 8.0) | 100 ml |
| アクリル酸 10% 水溶液 (v/v) | 50 ml |
| 1・4 ブタンジオール 100% | 50 ml |
| 水 | 800 ml |

実施例 5

実施例 1 と同様にして得た TH886 株および TK4985 株の菌体懸濁液および粗酵素液をそれぞれ用い、次の反応系のもとでジアクリレートの

加水分解能を調べた。

| 反応組成 | | 添加量 |
|--------------|---------------|----------|
| リン酸バツフラー | IM(pH 8.0) | 0.2 ml |
| ジヒドロキシアクリレート | 0.2 % | 0.2 ml |
| 菌体懸濁液 | OD 660 = 10.0 | 0.6 ml |
| もしくは粗酵素液 | OD 280 = 150 | (0.6 ml) |

上記反応系を 80°C にインキュベートするとジヒドロキシアクリレートは 5 ~ 10 時間のうちに消失し、それに対応するアクリル酸エステルとアクリル酸とが生成した。

発明の効果：

本発明の新菌株 *Alcaligenes faecalis* TH836 および TK4985 はアクリル酸と二価アルコールとから水酸基を有するアクリル酸エステルを生産する能力を有する。この菌株を用いることによりアクリル酸と二価アルコールとを含有する反応系から水酸基を有するアクリル酸エステルを製造することができる。エステル化に必要な酵素は、培地の種

類に無関係に、菌体増殖に比例して生産される。このエステル生成物は工業材料となりうる重合体原料として有用である。この生成物を他の既知単体量と共重合して得られる高分子は粘着剤、接着剤、フィリムなどとして用いられる。しかも、この生成物は水酸基を有するため、親水性をもちしかも官能基としても作用するので、他の多くの用途に利用される。

さらに、本菌株を用いたエステル反応においてジアクリレートがほとんど生成されない。ジアクリレートが系内に生成されなければ、重合反応中にゲル化が起こらず、したがつてエステル反応出発物質の高濃度仕込みが可能となる。その結果、新規な特徴をもつ高分子を得ることも可能である。微量ながらジアクリレートが系内に生成されても、本菌株はいずれもこれに対応するアクリル酸エステルとアクリル酸とに加水分解する能力を有するという利点がある。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は本発明の菌株 *Alcaligenes faecalis* TH836

のエステル化酵素の安定性を示す図。第 2 図は同じく TH836 株のエステル化酵素の pH による影響を示す図。第 3 図は同じく TH836 株のエステル生成能の 1-4 ブタンジオール濃度による影響を示す図である。

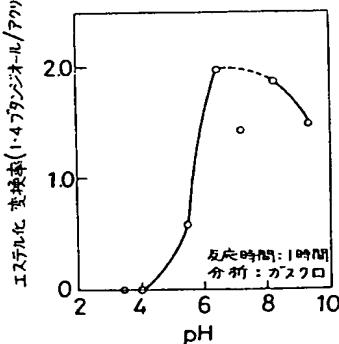
以上

代理人 弁理士 山本秀一策

第 1 図



第 2 図



第3図

